

Protocolos y técnicas analíticas e instrumentales para evaluar el impacto del fuego sobre la materia orgánica del suelo

Gonzalo Almendros¹, Francisco J. González-Vila², José A. González-Pérez², Heike Knicker² y José M. de la Rosa^{2,3}

¹ Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), Serrano 115B, 28006, Madrid. humus@ccma.csic.es

² Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC), Avda. Reina Mercedes 10, 41012, Sevilla.

³ Grupo de Química Analítica e Ambiental, Instituto Tecnológico e Nuclear, Estrada Nacional 10, 2686-953, Sacavém, Portugal.

RESUMEN

En este capítulo se describen metodologías y técnicas actuales para el estudio de la materia orgánica (MO) del suelo. Se han seleccionado aquellas que aportan información más específica a la hora de evaluar el impacto de los incendios sobre los distintos tipos de constituyentes orgánicos del suelo. Se incluyen métodos modernos para el análisis de la MO total, así como procedimientos para su fraccionamiento y para el aislamiento y cuantificación de las distintas formas de MO. Se revisan los principales métodos vigentes, tanto destructivos como no destructivos, para la caracterización químico-estructural de todas las formas de MO, centrando el interés en los más apropiados para determinar el grado de alteración de la MO por efecto del fuego.

INTRODUCCIÓN

La importancia del estudio de la Materia Orgánica (MO) del suelo como medida del impacto del fuego se fundamenta en dos principios básicos: i) la MO es un agente activo en el funcionamiento del suelo, con capacidad de ejercer un efecto directo e indirecto en la productividad y estabilidad a largo plazo de los ecosistemas; y ii) la composición del humus refleja factores propios y externos al medio, lo que permite un diagnóstico precoz de los cambios en los ciclos biogeoquímicos en ecosistemas afectados por perturbaciones.

En trabajos anteriores, se han estudiado las alteraciones que experimenta la MO de suelos completos y sus fracciones húmicas aisladas por efecto del fuego, aplicando aproximaciones experimentales que incluyen la comparación de suelos procedentes de ecosistemas incendiados e inalterados y experimentos bajo condiciones controladas de laboratorio. Los resultados obtenidos, revisados recientemente (González-Vila y Almendros, 2004; González-Pérez et al., 2004a; González-Vila et al., 2009; Knicker et al., 2003a; Tinoco et al., 2005), describen los efectos detectados en los suelos debido al impacto del fuego y entre ellos se puede destacar: i) la importancia de la transformación abiótica de precursores alifáticos en macromoléculas aromáticas en ecosistemas actuales; ii) neoformación térmica de estructuras heterocíclicas de N; iii) cambios en la solubilidad de las fracciones solubles y coloidales de la MO; iv) Pérdida preferente de grupos funcionales oxigenados y de estructuras alifáticas O-alquílicas; y, v) cambios en la estructura macromolecular de la MO, probablemente relacionados con la acumulación de formas alquílicas resistentes.

En el presente capítulo se describen los protocolos y técnicas utilizados para el aislamiento y análisis de la MO del suelo (MOS), que se consideran particularmente apropiados para evaluar el impacto del fuego sobre la misma. La mayor parte de esta metodología está incluida en las respectivas secciones experimentales de artículos sobre impacto del fuego en la MOS, anteriormente publicados (Almendros et al., 1992, 1988, 1990, 2003; González-Vila et al., 2009; Knicker et al., 2005a, 2007; Tinoco et al., 2006).

METODOLOGÍAS PARA LA CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA MATERIA ORGANICA DEL SUELO

A pesar del considerable progreso experimentado por la Química del Humus en los últimos treinta años, la estructura de la MOS continúa sin ser conocida en su mayor parte. Los métodos clásicos de fraccionamiento de la MO permiten separar sus diferentes constituyentes (hidrosoluble, lípidos, materia particulada ligera, ácidos húmicos o ácidos fúlvicos) debido, por regla general, al diferente grado de asociación entre las fracciones orgánicas y la fase mineral.

En relación con los aspectos estructurales a nivel molecular existen multitud de investigaciones que se centran en la fracción de sustancias húmicas (SH), por considerar que su naturaleza varía en los distintos suelos, que refleja en su composición el impacto de los factores formadores, y que puede constituir una fuente de información sobre la estructura del sistema trófico y el funcionamiento del suelo. Además, el conocimiento de la síntesis, estructura y las reacciones de las SH con otros componentes del suelo, es de gran interés desde el punto de vista ambiental debido a su capacidad para reflejar los procesos de degradación de los ecosistemas por perturbaciones externas tales como el fuego (Almendros et al., 1984a, b, c; González-Vila y Almendros, 2004; González-Pérez et al., 2004a; Knicker et al., 1996).

Frente a los conceptos clásicos que consideraban las SH como macromoléculas vegetales alteradas, los estudios más recientes han puesto de manifiesto su composición química característica, su origen por mecanismos simultáneos de alteración y neoformación, y su actividad reguladora de procesos físicos y químicos en los suelos (Almendros, 2008; Schnitzer, 1972; Stevenson, 1982). Aunque muy probablemente se requieran aun muchos más años para obtener un modelo válido de los sistemas coloidales del humus, en la actualidad se asiste al desarrollo creciente de investigaciones específicas, no limitadas a la aplicación generalizada de planteamientos procedentes de la química de la lignina y del carbón.

De esta manera, muchos estudios profundizan en la importante y variada información que proporciona el estudio de los lípidos del suelo, que engloban una parte importante de las sustancias no húmicas (Breger, 1966; Dinel et al., 1990; Stevenson, 1982). A ello ha contribuido, por una parte, la evidencia de la importante contribución del material alifático en el conjunto de los procesos de humificación (Almendros et al., 1991; Hempfling et al., 1989; Kögel-Knabner et al., 1992; Nip, 1966), así como el hecho de que la hidrofobicidad, estrechamente relacionada con la fracción lipídica y en parte con el efecto del fuego, juega un papel importante en propiedades del suelo tales como su estabilidad y su capacidad de retención de agua (DeBano, 2000; Doerr et al., 2000; Jambu et al., 1978; Savage et al., 1972; Dinel et al., 1990).

Para el estudio del impacto del fuego en una matriz tan compleja como es la MOS, se requiere un enfoque multidisciplinar, aplicando diferentes técnicas que informan sobre aspectos parciales, en ocasiones no totalmente concordantes, pero necesarias para obtener una visión de conjunto del sistema. Aparte de los métodos clásicos de fraccionamiento de la MO, que permiten separar sus diferentes constituyentes (materia particulada ligera, lípidos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, etc.), y que se basan, por regla general, en la diferente estabilidad de los enlaces organo-minerales), existen multitud de investigaciones que se centran en la fracción de ácidos húmicos. Debido a su naturaleza, los ácidos húmicos varían de un suelo a otro y en su composición reflejan el impacto de distintos factores que han actuado o actúan en la formación del suelo. De esta forma, los ácidos húmicos constituyen una fuente de información valiosa sobre la estructura del sistema trófico y el funcionamiento general del suelo (Almendros et al., 1983, a, b, c; 1985, 1989a; González-Vila et al., 2006; Iglesias et al., 2008, Knicker et al., 2006a, b, c; 2007).

Carbono orgánico total

El carbono el suelo se ha determinado tradicionalmente por dos métodos independientes: por oxidación en seco –o calcinación– y por oxidación por vía húmeda utilizando oxidantes energéticos como son el dicromato o el permanganato potásico.

La oxidación en seco consiste en el calentamiento del suelo en un horno y la estimación del carbono suele hacerse gravimétricamente o determinando el CO₂ proveniente de la combustión (p.ej., calcinación a 550 °C). Para muchos tipos de suelo, la estimación gravimétrica del carbono suele provocar errores experimentales debido a deshidratación y descarbonatación de minerales y por ello suele aplicarse sólo en suelos orgánicos. Estos procedimientos no son adecuados para suelos que contengan carbonatos (~12% C), pues las alternativas de descontar el porcentaje de carbono inorgánico determinado independientemente o de descarbonatar previamente el suelo tratándolo con ácidos, suele plantear problemas que no se dan cuando los carbonatos son constituyentes menores del suelo.

El método alternativo, de oxidación por vía húmeda (ver figura1), presenta la ventaja de no estar afectado por la presencia de carbonatos, pero tampoco está libre de errores experimentales. En este caso pueden venir dados por interferencias con otros compuestos reductores presentes en el suelo y distintos de la MO, pero sobre todo por el hecho de que el cálculo del carbono obtenido por reacciones redox suele incluir en la fórmula factores correctores empíricos para corregir la oxidación parcial del C en la muestra (a no ser que la reacción incluya un calentamiento externo y durante tiempo prolongado) y porque los factores para convertir el poder reductor en contenido en carbono suelen estar basados en compuestos de referencia (glucosa) que no tienen un estado de oxidación comparable al de todas las formas de MO presentes y que además varían en los distintos tipos de suelo.

En el caso de los suelos afectados por el fuego hay que tener en cuenta que la determinación del carbono idealmente debería incluir no sólo el “carbono oxidable” (MO) sino también las formas carbonizadas (González-Pérez et al., 2002a, b, 2004b; González-Vila, 2002; Knicker et al., 2003b, 2006a, b, c) recientes o fósiles (carbón vegetal y mineral, *black carbon* y grafito). Algunos de estos materiales carbonizados pueden contener cerca del 100% de carbono, si bien

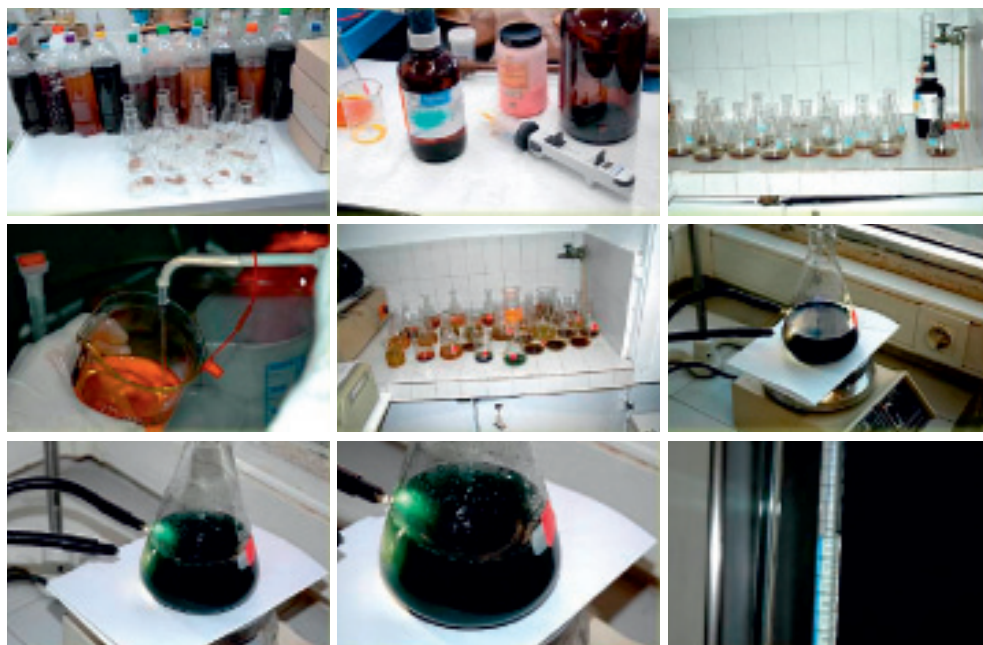


Figura 1. Análisis de carbono oxidable del suelo por la vía húmeda: de izquierda a derecha, de arriba abajo: tratamiento con ácido sulfúrico y dicromato; oxidación 30'; valoración con sal de Mohr.

por oxidación seca (dependiendo de la técnica y la pulverización de la muestra) suelen obtenerse valores por defecto cercanos al 60%. Por esta razón, las medidas de carbono total de suelos afectados por el fuego, con alto contenido en restos carbonizados, pueden estar subvaloradas y afectadas por un considerable error experimental.

Considerando estas diferencias entre los métodos experimentales, se han realizado propuestas de determinar el *black carbon* o las formas más o menos carbonizadas de MO en suelos afectados por el fuego, sustrayendo los resultados de C obtenido por oxidación en seco y en húmedo. Desde el punto de vista práctico, este procedimiento suele aportar resultados orientativos pero poco fiables, sobre todo si el contenido en material carbonizado es bajo, pues ha de considerarse que se suman las imprecisiones propias de ambos métodos.

Para convertir el porcentaje de carbono a MO, suele multiplicarse por un factor empírico próximo (frecuentemente 1,725, si bien en suelos forestales u orgánicos se suele aplicar el factor 2).

Determinación mediante oxidación por vía húmeda

Para la determinación de la MO se emplea el método de oxidación parcial del suelo con dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$ 1M) en medio ácido. El contenido de carbono orgánico se calcula valorando el exceso de dicromato potásico con sal de Mohr ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0,5M) y utilizando difenilamina como reactivo indicador (Walkley y Black, 1934). Para ello, se procede de la siguiente manera:

Se parte de 0,1-2 g de muestra (suelo o fracciones húmicas) pulverizada. La cantidad de muestra depende del contenido de C esperado: se pesan 2 g cuando se sospecha un contenido de MO menor al 1%, 1 g para muestras que pueda presentar entre 1-3%, o 0,5 g para contenidos superiores al 3%. La muestra se introduce en un matraz erlenmeyer de 500 cm³ y se agregan 10 cm³ de dicromato potásico 1M, y 20 cm³ de ácido sulfúrico concentrado, agitando durante 30 segundos, al cabo de los cuales se deja reposar durante media hora. A continuación, se agregan unos 200 cm³ de agua destilada y se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se añaden 10 cm³ de ácido fosfórico concentrado seguidos de 1 cm³ de solución indicadora de difenilamina, la cual se prepara disolviendo 0,5 g de difenilamina en polvo con 100 cm³ de H₂SO₄ concentrado y 20 cm³ de H₂O destilada. A continuación, se procede a la valoración del exceso de dicromato potásico que no ha reaccionado mediante la incorporación, con bureta, de solución de sal de Mohr 0,5M. La sal de Mohr se prepara disolviendo 197 g de (SO₄)₂Fe(NH₄)₂• 6H₂O en un litro de agua destilada, al que se le añaden 10 cm³ de H₂SO₄ concentrado.

En la valoración, el color de la mezcla de la solución cambia de azul oscuro a verde manzana. El porcentaje de C de la muestra viene dado por la ecuación: $C (\%) = [(B-M) \times 0,195 \times f] / P$, donde M es el volumen de sal de Mohr consumido durante la valoración de cada muestra, B es el volumen de sal de Mohr consumida en el blanco (sin suelo), P es el peso en gramos de la muestra y f es un factor de la sal de Mohr que corrige su normalidad. Este factor debe ser 1, excepto cuando la sal de Mohr está mal preparada o se ha oxidado con el tiempo y en presencia de la luz. Para calcular el factor de la sal de Mohr se titula una mezcla de 5 cm³ de sal de Mohr 0,5M, 250 cm³ de H₂O destilada y 5 cm³ de H₂SO₄ concentrado, introducidos en un matraz de 500 cm³, donde se procede a valorar el volumen de KMnO₄ 0,1N que reacciona con un volumen conocido de sal de Mohr al cambiar el color de incoloro al primer tono de rosa (color del permanganato). El factor de la sal de Mohr se calcula como: $F = M / 25$, donde M corresponde con el volumen de KMnO₄ 0,1N gastado al factorar. El porcentaje de MO se obtiene al multiplicar el C por el factor empírico 1,724 propuesto por Walkley (1947).

Nitrógeno orgánico total

El contenido en N total suele experimentar cambios significativos por efecto del fuego. En ocasiones, la relación C/N puede bajar tras el incendio, por perderse menos rápidamente que el C, que forma CO₂, en tanto que el N tiende a estabilizarse en formas heterocíclicas difícilmente degradables, como se comentarán más adelante.

Para la determinación del nitrógeno total del suelo se utiliza el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883 en Piper, 1950). Para ello, se pesa entre 0,5-1 g de muestra seca y molida en el molino de bolas, a la que se le añaden 0,5 g de una mezcla catalizadora (100 g de K₂SO₄ y 5 g de Se en polvo) y 5 cm³ de H₂SO₄ concentrado. La reacción se lleva a cabo durante unas 12 horas en un matraz Kjeldahl provisto de un pequeño embudo de rama larga para evitar proyecciones del ácido y sobre una manta calefactora. Durante los primeros 20 minutos se produce un ataque lento, después se incrementa la temperatura, terminándose la digestión en hora y media aproximadamente. Al finalizar la digestión, la mezcla de reacción aparece transparente e incolora, y se afora con agua destilada hasta 50 cm³ antes de la medición del N. Tras la reacción, todas las formas orgánicas

del nitrógeno del suelo se han transformado en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Su valoración se lleva a cabo por colorimetría utilizando un autoanalizador Technicon. El color azul se genera por el método de Berthelot, conocido como azul de indofenol, generado por la reacción entre amonio, fenol y NaClO en medio alcalino (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1973).

Fraccionamiento de la materia orgánica del suelo

La separación de las distintas fracciones de la MOS permite cuantificar una serie de constituyentes que, en función de su naturaleza (fracciones particuladas, solubles o coloidales), se denominan genéricamente con términos tales como MO libre, ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), humina ligada a óxidos o arcillas, y humina no extraíble o residual (Duchaufour, 1975; Duchaufour y Jacquin, 1975).

La composición de las fracciones orgánicas del suelo puede modificarse en gran medida tras los incendios. El contenido en fracciones particuladas (materia orgánica libre) puede disminuir o aumentar; en el segundo caso generalmente por aportes por parte de la vegetación quemada. Las otras fracciones experimentan una compleja dinámica por efecto del fuego: cambia su contenido en grupos funcionales y los ácidos fúlvicos se transforman en ácidos húmicos y, a su vez, estos en humina. Todo ello, depende de la intensidad y duración del fuego, y del mayor o menor aporte de necromasa parcialmente carbonizada, que también puede contener sustancia de tipo pseudomelanoidina (productos de deshidratación de carbohidratos) o productos de Maillard (macromoléculas que incorporan aminoácidos transformados) que tienen propiedades de solubilidad semejantes a los ácidos húmicos y fúlvicos (Almendros et al., 1989b; Maillard, 1916). Por ello, además del interés de estudiar los cambios en sus proporciones tras el efecto del fuego, ha de estudiarse su naturaleza química mediante técnicas como las que se detallarán más adelante.

Determinación de las fracciones de la materia orgánica libre

Materia orgánica de baja densidad

La MO libre se encuentra formada por fragmentos de raicillas, semillas, hifas de hongos, restos vegetales y microorganismos, que se encuentran incorporados en forma poco estable al complejo organo-mineral del suelo mediante enlaces predominantemente físicos que se rompen con relativa facilidad mediante agitación mecánica. Por ello, para determinar la MO libre es necesario romper los agregados del suelo y separar las fracciones resultantes por diferencia de densidad. Este procedimiento es exclusivamente físico, como lo son los mecanismos de retención o incorporación de la MO libre (fracción particulada ligera) al suelo (Figuras 2 y 3).

Para su determinación se pesan 20 g de suelo, se transfieren a tubos de centrifuga y se añaden 70 cm³ de ácido fosfórico 2M (densidad 1,2 g cm⁻³) (Dabin, 1971). Si las muestras contienen carbonatos (comprobado previamente mediante el test cualitativo con HCl) se agregan unas gotas de octanol para evitar la formación de espuma. A continuación, se agitan las muestras con un agitador de varilla (1 min) y se centrifugan 5 minutos a 1,935 g. Una vez centrifugados los tubos, se filtra la suspensión sobrenadante y se recoge la MO libre. Los papeles de filtro (de unos 20 cm de diámetro), donde queda retenida esta fracción de partículas flotantes

PROTOCOLOS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS E INSTRUMENTALES PARA EVALUAR
EL IMPACTO DEL FUEGO SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO



Figura 2. Separación de la materia orgánica libre de densidad inferior a 1.1. Suspensión del suelo en ácidos fosfórico 2M; tratamiento con octanol, agitación, centrifugación, separación por filtración, pesada.



Figura 3. Separación de la materia orgánica libre de densidad comprendida entre 1,1 y 1,8. Suspensión del suelo en mezcla de bromoformo con alcohol, centrifugación, separación por filtración, desecación en estufa, pesada.

del suelo, se lavan repetidas veces con abundante agua caliente para eliminar los restos de ácido fosfórico concentrado (no volátil) que impregna las partículas de MO. De esta manera se evita que contribuya al peso de la muestra o deteriore el papel de filtro al evaporarse el agua. Se puede comprobar el pH del papel de filtro hasta que esté próximo a 7. La solución sobrenadante recuperada tras filtrar la suspensión con la MO libre se conserva para la posterior determinación, en su caso, de los ácidos fúlvicos libres (AFL), sobre todo si presenta una intensa coloración amarilla. Los papeles de filtro se secan en la estufa (60 °C) y posteriormente se separa la MO libre del papel, determinándose su peso seco. La MO libre se guarda para la posterior determinación de su contenido de C.

Extracción de los lípidos del suelo

Los lípidos del suelo constituyen una mezcla heterogénea de gran número de compuestos que presentan la característica común de ser solubles en disolventes orgánicos. Dentro de esta fracción se encuentran desde compuestos relativamente sencillos como alcanos y ácidos grasos, hasta moléculas complejas como terpenos, ceras, resinas, clorofilas o esteroides. La fracción de lípidos también incluye sustancias macromoleculares de estructura poco conocida, no volátiles en las condiciones habituales de cromatografía de gases y que posiblemente incluye triglicéridos, poliésteres, fosfátidos, estóridos, poliprenoles, esteril ésteres, resinas, oligómeros de macromoléculas lipídicas de plantas y microorganismos.

Los lípidos son importantes marcadores del efecto del fuego. Acusan cuantitativamente su impacto en forma de cambios en las proporciones de sus constituyentes. Por ejemplo, el fuego modifica la longitud de cadena de los compuestos alquílicos, reduce las diferencias entre los compuestos homólogos con número par e impar de átomos de carbono permitiendo distinguir las series de compuestos en estos suelos de las formadas por la vegetación y se destruye de manera selectiva muchos compuestos cíclicos que dan lugar a otros, como por ejemplo el ácido levopimarico que experimenta apertura de anillo y da lugar a ácidos de secodehidroabiéticos (Almendros et al., 1988; Dettweiler et al., 2003).

Extracción discontinua a temperatura ambiente

Para la extracción de los lípidos de suelo se puede utilizar como disolvente orgánico la mezcla diclorometano-metanol 3:1 (50 cm³ de diclorometano (CH₂Cl₂) con 25 cm³ de metanol (CH₃OH)), para extraer preferentemente las moléculas libres. Para realizar la extracción, se pesan unos 3 g de suelo (muestra seca y homogenizada por un tamiz 2 mm de luz) en un frasco de vidrio Pyrex® (con tapón de rosca) y se le añaden 75 cm³ de diclorometano-metanol 3:1 v:v. Se agita, y se dispersa durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos. Pasado este tiempo, se filtra la solución (extracto orgánico) en un matraz de cuello esmerilado y se repite nuevamente esta operación con el residuo sedimentado (residuo I). Se mezclan ambos filtrados en el mismo matraz. Para eliminar el agua que puede haberse extraído con los solventes orgánicos, se añade al extracto una cucharadita de sulfato sodio anhidro, se agita y se deja reposar durante 20 minutos. A continuación, se filtra nuevamente y se conserva la fase orgánica deshidratada. Ésta se evapora en un rotavapor hasta que quedan unos 10 cm³, momento en el cual se pasa el extracto orgánico a un vial de 15 cm³ y se deja



Figura 4. Extracción de lípidos en discontinuo en frascos cerrados en estufa a 60 °C: Tratamiento con diclorometano-metanol; agitación y extracción en estufa previa a filtración y evaporación del solvente.

evaporar dentro de una estufa a 35 °C. Una vez seca la fracción lipídica, se vuelve a pesar el vial y se calcula el peso de lípidos del suelo en porcentaje de peso seco de la muestra (Figura 4).

Extracción en continuo

Cuando se precisa obtener una cantidad de lípidos suficiente para su posterior fraccionamiento o el empleo de determinadas técnicas, se puede partir de muestras de unos 50–100 g de suelo, introducidos en un cartucho de celulosa, que a su vez se introduce en un extractor Soxhlet utilizando un extractante orgánico, por ejemplo, éter de petróleo (40–60 °C). Después de 24 h de extracción a reflujo, el extracto se deseca sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina a 60 °C. Finalmente las muestras se almacenan en viales bajo atmósfera inerte (Figura 5).

En general, se recomienda utilizar un disolvente de baja polaridad cuando se desea evitar la extracción de excesiva proporción de sustancias macromoleculares no volátiles. Cuando se pretende extraer preferentemente moléculas libres, no se aplican pretratamientos hidrolíticos o desmineralizantes para liberar fracciones lipídicas fijadas al suelo.

Alquilación (metilación, silanización, etc.) de lípidos

Con el objetivo de mejorar la resolución de estudios posteriores por cromatografía de gases y espectrometría de masas, se pueden metilar los lípidos. Las muestras evaporadas se tratan con un exceso de trimetilsilildiazometano (aproximadamente 0,05–0,1 cm^3) y se tapan (Aoyama y Shiori, 1990). Al día siguiente, se abren los botes para que se evapore el agente metilante en una campana extractora de gases y, una vez secos, se guardan cerrados en la nevera. Para la sililación, las muestras se disuelven en piridina, añadiendo trimetilsililimidazol y la mezcla se calienta a 65 °C durante media hora (Pierce, 1977).

La metilación derivatiza los ácidos (a metilésteres, $-\text{COOCH}_3$) y los grupos OH fenólicos (a metoxifenoles, $-\text{OCH}_3$). La silanización forma trimetilsililderivados con ácidos y fenoles, pero también con grupos OH alcohólicos.

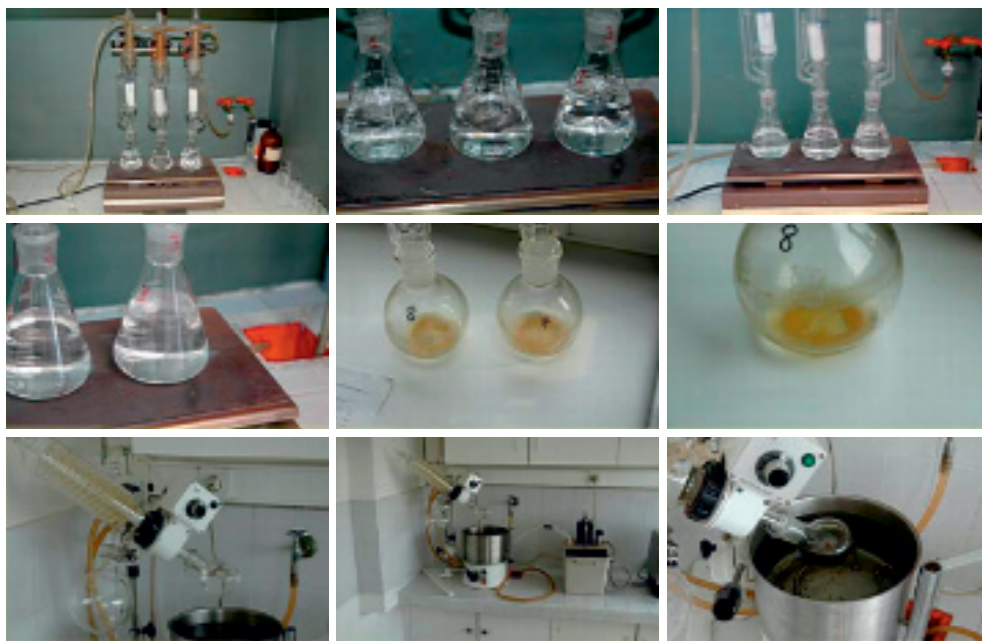


Figura 5. Extracción de en continuo de lípidos del suelo con aparatos de Soxhlet: extractores en funcionamiento; recuperación de los extractos; evaporación tras deshidratación con sulfato sódico anhidro; evaporación a presión reducida.

Sustancias húmicas

El estudio de la MO humificada del suelo incluye extracción, valoración y en su caso, aislamiento y purificación de tres fracciones que se definen principalmente por sus propiedades de solubilidad: i) ácidos húmicos (solubles a pH alcalino, insolubles a pH ácido), ácidos fúlvicos (solubles a pH ácidos) y humina (insoluble a todos los valores de pH y generalmente asociada fuertemente a la fracción mineral).

Determinación de los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos

Para la extracción de los ácidos húmicos y ácidos fúlvicos se parte de muestras de suelo a las cuales se ha separado previamente la MO ligera y en algunos casos también la fracción lipídica, mediante los métodos descritos anteriormente. Como primera solución extractante se utiliza el pirofosfato sódico 0,1M ($44.6 \text{ g Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ en 1000 cm^3 de agua destilada), para lo cual se añaden unos 200 cm^3 de esta solución por cada $10\text{--}50 \text{ g}$ de muestra utilizando frascos de centrifuga que se mantienen en agitación durante $5\text{--}6$ horas. Pasado este tiempo, se centrifuga 5 minutos a 1.935 g y la solución sobrenadante, que contiene la solución húmica, se transfiere a una botella. A continuación, se aplica la segunda solución extractante de hidróxido sódico $0,1\text{M}$ (4 g NaOH en 1.000 cm^3 de agua destilada), se mantiene en agitación por 4 horas y se centrifuga durante 5 minutos a 1.935 g (Figura 6).

Esta operación se repite hasta que el extracto final presente una coloración poco intensa. El tratamiento previo con pirofosfato ejerce un efecto descomplejante de la MO, precipita los metales bivalentes con que se encontraban asociadas las SH y las solubiliza en forma de sales sódicas (humatos y fulvatos). El tratamiento con NaOH permite continuar el proceso de extracción, ahora basado exclusivamente en intercambio de sodio e incremento del pH, proceso que puede producir algunas alteraciones en la MO e incluso solvolisis (solubilización de sustancias no húmicas o de una parte de la humina). Por esta razón no se debe continuar el tratamiento con NaOH hasta que el color del extracto sea transparente. De hecho, si se observa un aumento en la intensidad del color en las últimas extracciones respecto a las precedentes es síntoma de hidrólisis y de la ocurrencia de neoformaciones en la humina o fracción insoluble de la MOS. Se ha indicado que el empleo de una atmósfera inerte (N_2) durante la extracción (burbujeando nitrógeno durante unos segundos en los frascos de centrifuga antes de la agitación, y guardando los extractos que se van obteniendo en botellas cerradas tratadas de la misma forma) evita o reduce estas oxidaciones secundarias y alteraciones de la MO no deseadas.

La extracción de SH puede llevarse a cabo exclusivamente mediante NaOH y prescindiendo del $Na_4P_2O_7$. Este proceso facilita la purificación de las SH con una menor proporción de sales. Sin embargo, en los suelos fuertemente carbonatados, es necesaria la decarbonatación previa



Figura 6. Extracción de SH extraíbles: Tratamiento con pirofosfato (e hidróxido sódicos 0.1M). Agitación, equilibrado de tubos y centrifugación. Separación del extracto y el residuo. Decantación de los sucesivos extractos.



Figura 7. Valoración cuantitativa de las fracciones de extracto total (ácidos húmicos y ácidos fúlvicos): Toma de alícuotas del extracto total; toma de alícuotas para ser precipitadas a pH=1 y centrifugadas; ácidos húmicos redissueltos en NaOH; desecación al baño; muestras desecadas preparadas para valoración de C.

del suelo, o bien tratarlos previamente pirofosfato, de lo contrario el efecto del hidróxido sódico es insuficiente para extraer las SH precipitadas por el calcio.

La determinación de los ácidos húmicos y ácidos fúlvicos se realiza de manera paralela (Figura 7). Por una parte, se toma una fracción alícuota de 50 cm³ del extracto húmico total (pipeta) y se transfiere a un vaso de precipitados; se evapora al baño María a 60 °C y se determina el C del extracto húmico total (AH+AF) por el método de oxidación en húmedo con dicromato potásico. No son adecuadas las desecaciones sobre placa calefactora ni en estufa. La desecación del extracto puede ser una fuente de error analítico al comparar valores de diferentes tandas analíticas, si el tiempo de desecación, la temperatura o el volumen de la alícuota tomada ha sido muy diferente entre muestras.

Para la determinación de los ácidos húmicos, se toma otra alícuota de 25 cm³ del extracto, se agrega aproximadamente 1 cm³ de H₂SO₄ 1:1 hasta que el pH sea ácido (pH= 1) y se centrifuga 5 minutos a 4.355 g. La solución acuosa se desecha y el precipitado constituido por los ácidos húmicos, en forma de gel, se redissuelve con NaOH 0,5M (20 g en 1000 cm³ de agua destilada) hasta pH básico (pH >8). A continuación se evapora al baño María y se determina el C mediante el método de oxidación en húmedo. De esta manera se obtiene el contenido en C de los ácidos húmicos, expresado en g C 100 g⁻¹ suelo. La concentración de los ácido fúlvicos se calcula por diferencia entre el C del extracto húmico total anteriormente obtenido y el C de los ácidos húmicos (CAF= CAH+AF – CAH). El residuo II, donde se encuentra la fracción mineral del suelo y las huminas, se deseca en la estufa a 60 °C durante 24 horas y se conserva para determinar su contenido en C.

Purificación de ácidos húmicos para su posterior caracterización

Los ácidos húmicos todavía pueden contener una proporción apreciable de arcilla fina. Por ello, el ultimo precipitado de ácidos húmicos procedente del extracto total, se redissuelve en NaOH

0,5M y se centrifuga a 31.360 g durante 5 minutos. El resultado es un sedimento que contiene las arcillas y una solución sobrenadante de color marrón muy oscuro que contiene los ácidos húmicos en forma de sal sódica. A continuación se separan las fases y se añade HCl hasta pH 1 al sobrenadante para precipitar los ácidos húmicos. Finalmente se centrifuga a 4.355 g por 5 minutos para obtener un precipitado de ácido húmico purificado (sin arcillas) (Figuras 8 y 9).

A continuación, se procede a la eliminación de sales (fundamentalmente cloruro sódico, fosfatos, etc.) que se han incorporado durante la extracción de las SH (Figura 9). Para ello, se introducen los ácidos húmicos en bolsas de diálisis (por ejemplo Visking®, intervalo de pesos moleculares 12.000–14.000; diámetro de poro ca. 25 Å, si bien los tubos de celofán industrial son adecuadas para estos fines) y se sumergen en un recipiente con agua destilada durante varios días, renovando el agua 2 ó 3 veces al día. La diálisis termina cuando ya no se observa reacción positiva con AgNO_3 , se abren las bolsas, se vierte su contenido en placas Petri y se secan en la estufa a 50 °C durante 48 horas. Una vez evaporada el agua, los ácidos húmicos se desprenden de la placa con una espátula y se guardan para una posterior caracterización química. El empleo de liofilizadores para la desecación final de las sustancias de tupo húmico suele requerir mucho tiempo y las ventajas respecto a las características de la muestra final no suelen ser importantes si atendemos a los resultados obtenidos con la mayor parte de técnicas que pueden aplicarse posteriormente a las SH purificadas.



Figura 8. Eliminación de arcillas en de ácidos húmicos; precipitación a pH ácido; redisolución de los ácidos húmicos en NaOH 0.5M; ultracentrifugación a ~20000 rpm para sedimentar la arcilla y otros coloides insolubles en NaOH.



Figura 9. Diálisis de ácidos húmicos para eliminación de impurezas minerales solubles: Relleno de tubos de celofán, diálisis frente a agua destilada con agitación suave; test positivo con AgNO_3 que indica que debe seguirse renovando el agua destilada; Apertura de las bolsas y del ácido húmico.

Extracción de huminas ligadas a óxidos y arcillas

La humina, denominada “de insolubilización extraíble”, está formada por sustancias similares a los ácidos húmicos y fúlvicos unidos irreversiblemente a las arcillas, óxidos de hierro y aluminio (Merlet, 1971). Para poder cuantificarla se debe tratar el residuo de suelo con ditionito (dithionito, hidrosulfito) sódico, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, un potente reductor que disuelve los óxidos de hierro y aluminio, seguido por tratamientos con ácido fluorhídrico (HF) que disuelve la sílice de los minerales rompiendo los enlaces del complejo arcilla-humus. Una vez eliminadas las arcillas se aplica hidróxido sódico para extraer y cuantificar la humina extraíble (Figura 10).

El procedimiento consiste en procesar el residuo de la extracción anterior, donde se han extraído previamente los ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, y que todavía se encuentra en el fondo de los tubos de centrifuga, añadiendo los reactivos, agitando y calentando al baño María a 60°C . En cada tubo se añaden 100 cm^3 de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 60 mM y se agita periódicamente durante media hora. Este proceso se repite tres veces. Pasado este tiempo, se centrifuga a 756 g y se desecha el sobrenadante con los productos de reacción de los óxidos y se guarda el residuo III (huminas + arcillas). A este residuo III se le agregan 100 cm^3 de HF-HCl 1M (53 cm^3 de HF + $81,04\text{ cm}^3$ de HCl en 1.000 cm^3 de agua destilada). Al igual que en el paso anterior, los tubos se mantienen en un baño de agua a 60°C . Este tratamiento se repite tres o cuatro veces, centrifugando los

tubos y desechando el sobrenadante que en este caso contiene los productos de disolución de los silicatos provenientes de las arcillas. A continuación, se lava el residuo resultante con agua para eliminar los restos de reactivos y se centrifuga nuevamente.

Una vez extraídos los óxidos de hierro y aluminio, así como los silicatos de las arcillas (Figura 9), se procede a la extracción del C del suelo (humina extraíble) con reactivos alcalinos, como en el caso anterior de la separación previa de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Para ello, se añaden 100 cm³ de NaOH 0,5M y se agita. El sobrenadante corresponde a la humina extraíble, mientras que el precipitado representa la humina no extraíble (residuo IV). Este proceso se repite dos veces y el contenido de C se cuantifica en cada una de las fracciones por los métodos anteriormente descritos. El contenido de humina no extraíble se calcula por diferencia entre el C total del suelo y el C del resto de fracciones orgánicas (MO libre, ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas extraíbles) (Figura 10).

Determinación de la actividad biológica del suelo

Normalmente consiste en determinar la actividad respiratoria del suelo en condiciones de laboratorio. Para ello, se realiza un ensayo *in vitro* incubando el suelo en un matraz a temperatura y



Figura 10. Desmineralización del residuo de extracción del suelo para la liberación y determinación de la humina extraíble: Tratamiento con ditionito sódico; homogeneización y reacción al baño de agua; tratamiento posterior con ácidos desmineralizantes (HF, HCl).



Figura 11. Incubación de muestras para actividad biológica. Preparación de matraces y ajuste de humedad; analizador de gas (por conductividad eléctrica); matraz con muestra de suelo durante la medición; registro de actividad de diferentes muestras.

humedad constante en condiciones aerobias (la atmósfera del matraz se renueva periódicamente) durante un periodo de unos 15 a 30 días. Al referir los valores obtenidos respecto al contenido de C de cada muestra se obtiene la tasa de mineralización del suelo expresado en $\text{mg C } 100 \text{ g}^{-1} \text{ C}$ de suelo (Chone et al., 1973) (Figura 11).

Antes de realizar la incubación se calcula la humedad de la muestra y se ajusta el contenido de agua a un valor recomendado de 2/3 de la capacidad de retención hídrica a presión atmosférica. Para la medición diaria de la respiración se toman 20 g de muestra homogenizada a 2 mm y a un 2/3 de la capacidad de retención hídrica en matraces de 250 cm^3 , cerrados con un tapón provisto de dos tubos para la entrada y salida de gases. La incubación se realiza a 27 °C durante 20-30 días. El CO_2 desprendido se mide conectando el tubo de entrada a una columna de cal sodada que proporciona aire libre de CO_2 y desplaza el CO_2 del matraz hacia el tubo de salida. El tubo de salida se conecta a un analizador de gas Carmograph-12 (Wösthoff) que detecta los cambios en la conductividad eléctrica de una solución de NaOH en la que burbujea el gas que se analiza y se obtiene la tasa de respiración como g CO_2 en 20 g de muestra (Almendros et al., 1990).

Si no se dispone de analizador de CO_2 , la tasa de respiración de suelos también se puede determinar mediante titulación con HCl (Chone et al., 1973). Para ello, se hace burbujear el aire de salida a través de una columna con placa difusora para la absorción del CO_2 con 25 cm^3 de NaOH 0,25 M durante 12–15 minutos. Tras la absorción del CO_2 por la solución de NaOH se añaden 3 cm^3 de BaCl_2 20%, unas gotas de timolftaleína 3% como indicador y se titula con HCl 0,2 M. La concentración de CO_2 en la muestra se calcula a partir del volumen de HCl necesario para el cambio de color de azul a incoloro y el CO_2 desprendido se calcula mediante la fórmula: $\text{mg CO}_2 = 1,2 \times (\text{M} - \text{B})$, donde M es el volumen de HCl consumido por la muestra y B es el volumen consumido por el blanco (sin muestra).

MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS (ESPECTROSCÓPICOS) PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS

La absorción de la radiación UV-visible en las macromoléculas húmicas es atribuida a la presencia de grupos cromóforos y radicales libres estables. Se ha observado empíricamente que la intensidad del color de las SH está relacionada con la aromaticidad y que ésta incrementa con la humificación (madurez). De esta manera se asocia el progresivo oscurecimiento con una mayor evolución de la MO (Traina et al., 1990). Los espectros de absorción en el rango UV-visible de los ácidos húmicos son monótonos, es decir, no presentan máximos salvo en el caso especial de los ácidos húmicos de tipo "P" que incluyen en su estructura derivados quinónicos de origen microbiano (Kumada, 1955). La intensidad del color, a igualdad de concentración de C, es un carácter diferencial de las muestras de ácido húmicos.

La relación de absorbancias a 465 y 665 nm de los ácidos húmicos y ácidos fúlvicos es la E4/E6. Las absorbancias dependen de la concentración pero la relación E4/E6 es independiente de ella y tiene un valor constante en un rango muy amplio de concentraciones. La relación E4/E6 decrece cuando aumenta el peso molecular, el grado de condensación y la aromaticidad (Chen et al., 1977; Kononova, 1982). La relación E4/E6 se ha utilizado como indicador de los procesos de humificación.

Espectroscopía en el rango visible

Para la determinación de la densidad óptica, los ácidos húmicos se disuelven en hidróxido sódico 0,01M a una concentración de 0,2 mg C cm⁻³ (Kononova, 1982); se pesan 10 mg en 50 cm³ de NaOH 0,01M. La densidad óptica de cada muestra se determina, por ejemplo, en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A VIS-UV (detector de matriz de diodos "diode array" que adquiere espectros en tiempo real) (Figura 12). Con objeto de investigar la presencia de compuestos específicos, que pueden formar parte de la fracción de ácidos húmicos, y que contribuyen al espectro (en principio monótono) con máximos poco marcados (debido a su baja concentración), como

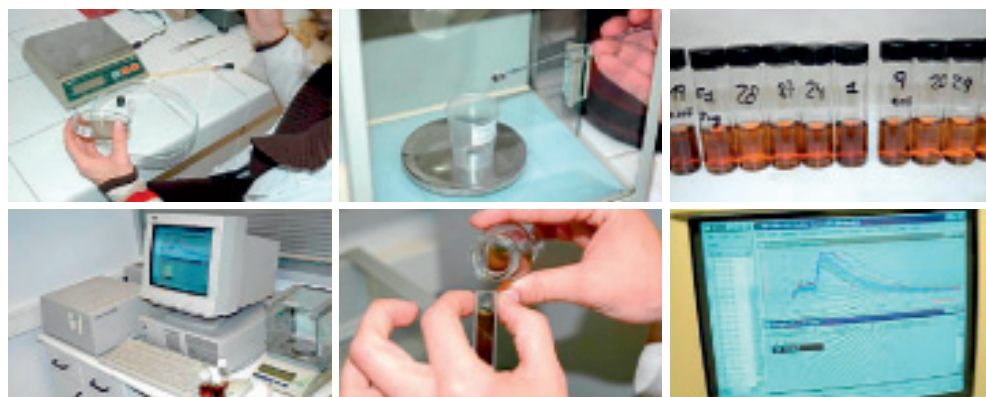


Figura 12. Preparación de soluciones de concentración constante y adquisición de espectros visible de ácidos húmicos.

es el caso bien estudiado de las perilenquinonas procedentes de melaninas fúngicas, puede aplicarse una técnica para mejorar la resolución de los espectros. Ésta consiste en aplicar la 2ª derivada del espectro visible y de esta manera puede obtenerse un conjunto de picos y valles característicos (Almendros y Dorado, 1985).

Espectroscopía en el rango infrarrojo (IR)

La espectroscopía de absorción infrarroja (IR) mide la excitación vibracional de los átomos alrededor de los enlaces que los conectan (Figura 13). La posición de las líneas de absorción depende de la naturaleza de los grupos funcionales presentes y el espectro en su conjunto presenta un perfil característico para cada molécula. Un espectro de IR típico en el rango de infrarrojo medio comprende desde 400 a 4000 cm^{-1} . Al absorber radiación IR, las moléculas experimentan vibraciones de tensión (donde se modifica la distancia entre átomos) y de deformación (se modifica el ángulo de enlace). Los modos de vibración de un C tetraédrico incluyen: tensión simétrica y asimétrica y cuatro tipos de deformaciones denominadas de tijera (scissoring), balanceo ("rocking"), torsión ("twisting") o aleteo ("wagging"). La complejidad introducida por estas posibilidades hace difícil la interpretación directa de los espectros de IR cuando la muestra presenta estructura heterogénea o compleja. Los espectros IR de las SH y de las macromoléculas en general presentan un perfil sencillo constituido por pocas bandas relativamente anchas, si bien para el caso de los ácidos húmicos, esta simplicidad se debe precisamente a la complejidad de la mues-



Figura 13. Preparación de pastillas de KBr para adquisición de espectros infrarrojos: homogeneización de muestra; prensa de la muestra con KBr al vacío; extracción de las pastillas y adquisición del espectro.

tra (solapamiento de las bandas de absorción) y a los enlaces de hidrógeno (contribuyen al ensanchamiento de bandas, p.e. de hidroxilos a 3400 cm^{-1}) (MacCarthy y Rice, 1985).

Respecto a suelos afectados por incendios, la espectroscopía IR refleja preferentemente los cambios en los grupos funcionales oxigenados (p.ej., descarboxilación, que es una de las primeras reacciones que tiene lugar) y modificaciones estructurales en los grupos nitrogenados (por la gran absorptividad molar de las amidas). Los cambios en la proporción de constituyentes alifáticos son también patentes en función de la intensidad relativa (p.ej., respecto a la banda aromática a 1510 cm^{-1}) de la banda a 2920 cm^{-1} .

Los espectros IR, se adquieren a partir de pastillas preparadas con 3 mg de ácido húmico y 200 mg de KBr. Para la obtención de dichas pastillas las muestras se homogeneizan en un mortero de ágata y se desecan a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un día para eliminar las trazas de agua. El rango de adquisición de los espectros suele estar entre 4000 y 400 cm^{-1} . Para facilitar el reconocimiento de patrones a partir de los espectros se procede a aumentar la resolución mediante un algoritmo basado en la sustracción del espectro original de un múltiplo positivo de la 2^{a} derivada, seguido por un suavizado (smoothing) mediante otro algoritmo de promedios lineales móviles (Rosenfeld y Kak, 1982; Almendros y Sanz, 1992).

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de C^{13} (RMN C^{13})

La espectroscopía de ^{13}C RMN proporciona información sobre la estructura y la proporción relativa de las diferentes unidades estructurales de las SH. La aplicación de la denominada “polarización cruzada” (CP) y “rotación en ángulo mágico” (MAS)” a la RMN de ^{13}C en estado sólido permite obtener espectros de alta resolución con tiempos de adquisición razonables (Figura 14). Sin embargo, la CPMAS ^{13}C RMN (en estado sólido) se encuentra limitada por la menor resolución respecto a la espectroscopía de RMN en solución, pero presenta la gran ventaja de poderse aplicar al análisis de todo tipo de muestras poco solubles, como a suelos completos o sus fracciones, SH, etc., sin necesidad de extracción previa con disolventes orgánicos. De ésta manera se evitan problemas de alteración, pérdida de material y extracción selectiva.

Bajo condiciones de adquisición adecuadas, la RMN de ^{13}C puede ser cuantitativa. Los espectros pueden dividirse en regiones correspondientes a distintos tipos de Cs (fundamentalmente alquílicos, O-alquílicos, aromáticos o insaturados y carbonilos), cuyas áreas informan sobre la promoción de estas unidades estructurales en la MO. Si bien suelen integrarse intervalos relativamente anchos en el caso de las sustancias macromoleculares, también pueden integrarse las áreas de picos característicos de algunos tipos de C (Knicker et al., 2003c, 2006a).

En todos los espectros se integran las 4 regiones principales correspondientes a los diferentes Cs: alquílico ($0\text{--}46\text{ ppm}$), O-alquílico ($46\text{--}110\text{ ppm}$), aromático ($110\text{--}160\text{ ppm}$) y carbonílico ($160\text{--}220\text{ ppm}$), así como las distintas subregiones: C-alquílico móvil ($0\text{--}25\text{ ppm}$), C-alquílico rígido ($25\text{--}46\text{ ppm}$), C en los alcoholes primarios y secundarios, éteres y aminas ($60\text{--}90\text{ ppm}$), C acetálico en carbohidratos y C cuaternario en taninos condensados ($90\text{--}110\text{ ppm}$), C aromático no sustituido o con sustituyentes de tipo alquílico ($110\text{--}140\text{ ppm}$), C aromático heterosustituido ($140\text{--}160\text{ ppm}$), C carbonílico en ácidos carboxílicos, ésteres y amidas ($160\text{--}190\text{ ppm}$) y C carbonílico en aldehídos y cetonas ($190\text{--}220\text{ ppm}$) (Wilson, 1987; Preston, 1996).

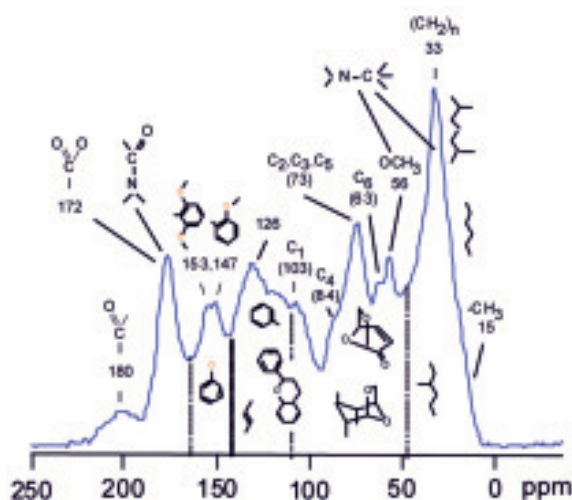


Figura 14. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectro obtenido de un ácido húmico. Los principales rangos espectrales son: 0–46 ppm= alquílico; 46–110 ppm= O-alquílico; 110–160 ppm= aromático/insaturado; 160–200 ppm= carbonilo.

Los espectros de RMN de ^{13}C de los ácidos húmicos se adquiere a 2,3 Tesla con un espectrómetro Bruker MSL 100 a 25,1 MHz en ^{13}C , bajo condiciones de polarización cruzada (CP) y rotación en el ángulo mágico (MAS). El intervalo entre pulsos es de 3 s, y el tiempo de contacto de 1 a 1,5 ms. Para cada espectro se acumulan entre 104 y 105 FIDs (*free induction decays*). La anchura de barrido es de 125 kHz y la de filtro de 25 kHz. El tiempo de adquisición es de 12,3 ms. La frecuencia de rotación en el ángulo mágico es de 4,3 kHz, empleando un rotor estándar de doble cavidad donde se colocan 300 mg de muestra. Las escalas de desplazamiento químico se calibran (0 ppm) con tetrametilsilano (TMS).

En el caso de los suelos afectados por el fuego, la RMN de ^{13}C es especialmente adecuada para mostrar los cambios en las estructuras aromáticas y alifáticas de la MOS, y fundamentalmente para mostrar la degradación (transformación) térmica preferente de las estructuras O-alquílicas (Almendros et al., 2005). Hay que tener en cuenta que deben tomarse precauciones si el suelo (o el analito) es rico en compuestos

paramagnéticos (p.ej. óxidos de Fe) o estructuras tipo grafito, como p.ej. hollín o carbones de rango elevado (antracita). En ambos casos, la dinámica de la polarización cruzada se ve afectada y se produce la pérdida selectiva de intensidad de grupos de C específicos. En el primero de los casos el problema puede resolverse eliminando los componentes paramagnéticos con ácido fluorhídrico (Gonçalves et al., 2003), pero las muestras ricas en estructuras grafiticas dan lugar a espectros de CPMAS RMN con información limitada.

Una secuencia de pulsos especial denominada Desfase Dipolar (Dipolar Dephasing) permite examinar la fuerza de las interacciones entre protones y Cs (Newman, 1990). Esta información puede utilizarse para determinar la protonación o grado de condensación de estructuras aromáticas en residuos de material carbonizado (Knicker et al., 2005b). Desafortunadamente, a veloci-

dades elevadas de MAS se producen ecos que interfieren la cuantificación (Wilson et al., 1984). También puede usarse alternativamente una secuencia de pulsos bidimensional llamada HECTOR.

Para estudiar el N en la fracción orgánica del suelo puede aplicarse la RMN de ^{15}N en estado sólido (Knicker, 2004). Debido a la baja abundancia en los suelos del isótopo ^{15}N la sensibilidad de la RMN de ^{15}N es aproximadamente 50 veces más baja que la de ^{13}C . En estudios comparados de suelos afectados y no afectados por incendios, se ha visto que en suelos no afectados por incendios casi todo el N orgánico se encuentra en estructuras tipo peptídico, mientras que en suelos afectados por el fuego la funcionalidad del N cambia a formas heterocíclicas que se forman debido al calentamiento de material nitrogenado (Almendros et al., 2003).

Actualmente suelen emplearse instrumentos de RMN con campos magnéticos entre 4,7 y 11,75 Tesla. Sin embargo, aunque la sensibilidad aumenta con la fuerza del campo magnético, el uso de instrumentos con más de 4,7 kHz requiere velocidades de MAS superiores a 8 kHz para evitar bandas de rotación laterales que solapan la intensidad de las señales, y secuencias de pulso especiales de amplitud variable para evitar pérdidas de intensidad de los Cs con débil interacción bipolar con protones (Peersen et al., 1993).

Normalmente, los espectros de CPMAS ^{13}C y ^{15}N RMN de muestras de suelos y SH se adquieren con retrasos de pulso entre 100 y 500 ms y tiempo de contacto de 1 ms (^{13}C) y 0,7 ms (^{15}N). Dependiendo de la concentración de C deben acumularse entre 10000 y 300000 barridos para obtener espectros fiables. Los espectros de ^{15}N RMN de MOS a abundancia natural sólo pueden obtenerse si la concentración de N es $> 2\%$. Incluso en estos casos solo se adquieren espectros válidos tras acumular más de un millón de barridos.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS BASADA EN MÉTODOS DESTRUCTIVOS

Análisis elemental orgánico de los ácidos húmicos

El análisis elemental permite conocer la concentración de C, H, N, S y O de muestras orgánicas. Se utiliza un analizador elemental (p.ej., Carlo-Erba EA-1108-CHNS), en el que los gases procedentes de la combustión de las muestras (900 °C) son arrastrados por una corriente de He y pasan a través de una columna de cromatografía de gases, siendo reconocidos cuantitativamente por un detector de conductividad eléctrica y representados en forma de picos cuya área es proporcional a los porcentajes de C, N, H. El aparato se calibra por comparación con los valores correspondientes a una sustancia patrón (acetanilida) previamente analizada en las mismas condiciones.

Van Krevelen (1950) propuso un método gráfico-estadístico basado en las relaciones atómicas de compuestos químicos de fórmula conocida, que permitía describir su estructura y los procesos que intervenían en la formación de complejos macromoleculares como el carbón. Este método se basa en un diagrama en el que se representa la relación atómica hidrógeno/ carbono (H/C) en el eje de las ordenadas y la relación atómica oxígeno/ carbono (O/C) en el eje de abscisas. Al representar dichas relaciones atómicas para sustancias de diferente naturaleza química, observó que las reacciones que intervenían en los procesos de carbonización y humificación –tales como las carboxilaciones, deshidrogenaciones y oxidaciones– quedaban definidas por las modificaciones de las coordenadas de los puntos en distintas zonas del gráfico. Encontró que la aro-

matización de la MO de turbas o carbones se encuentra asociada a reacciones de deshidratación y desmetilación o reacciones de deshidrogenación. Observó, igualmente que el calentamiento producía un efecto de aromatización de la MO, mientras que los procesos de oxidación eran responsables de emisiones de CO₂ y H₂O. De esta manera, el gráfico de Van Krevelen permite obtener una información preliminar de interés para conocer la proporción de diferentes tipos de unidades estructurales así como de la naturaleza más o menos aromática de las SH en estudio.

Pirólisis/cromatografía de gases-espectrometría de masas (Py-GC/MS).

La pirólisis es un método degradativo adecuado para el estudio de las sustancias orgánicas de elevado peso molecular (Figura 15). Se basa en el calentamiento de la muestra a alta temperatura (entre 500 y 700 °C) por un intervalo corto de tiempo y en atmósfera inerte. De esta manera se rompen las macromoléculas en constituyentes más pequeños que pueden identificarse mediante el estudio de sus espectros de masas, y/o por el tiempo de retención tras la inyección de patrones en un cromatógrafo de gases. La pirólisis tiene la ventaja de romper fácilmente enlaces tipo éster, éter y uniones C-C. Además se emplea muy poca muestra, no requiere derivatizaciones ni pretratamientos químicos de la muestra original (Schulten y Schnitzer, 1993; González-Vila et al, 2002; Piedra Buena et al., 2009 a,b).

La pirólisis de las muestras puede realizarse en un dispositivo Pyrojector (SGE Instruments) conectado a un sistema de GC/MS Finnigan Trace GC Ultra asociado a un espectrómetro de masas Trace DSQ. El cromatógrafo se equipa con una columna capilar HP-1 (30 m × 250 µm), y el flujo de He es ajustado a 1 cm³ min⁻¹. La temperatura inicial de 50 °C se alcanza en 1 min, luego se programa a 100 °C con una rampa de incremento de 30 °C min⁻¹, seguido por un incremento de 100 a 300 °C con una rampa de 10 °C min⁻¹ y una fase isoterma final de 320 °C. Los productos de la pirólisis de los ácidos húmicos (pirolizado) se identifican a partir de los espectros de masas de los diferentes picos separados por cromatografía. Se emplean librerías digitales Wiley, NIST (National Institute of Standards and Technology) y NBS (National Bureau of Standards), así como espectros de masas publicados en la bibliografía (Buurman et al., 2007; Nierop y Buurman, 2007). La estimación del área de los picos de los diferentes productos de pirólisis se calcula en forma de abundancias absolutas, es decir, ajustando la suma de las áreas de todos ellos al 100% del área del cromatograma del ión total.

Pirólisis en presencia de agentes alquilantes (termoquimiólisis con hidróxido de tetrametilamonio)

Por medio de este procedimiento (Challinor, 1991) la eficacia de la pirólisis se incrementa. Se produce una hidrólisis alcalina simultánea a la pirólisis durante el calentamiento de la muestra y las moléculas liberadas se metilan en el propio cromatógrafo separándose en forma de metilésteres (Martín et al, 1995). Esta técnica puede realizarse tanto, impregnando las muestras con compuestos alquilantes, normalmente se usa hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), como “off line” realizando la reacción en ampollas de vidrio cerradas a la llama y colocadas en el interior de un horno. En este segundo caso, la reacción se suele llevar a cabo a partir de muestras de 4 mg suspendidas en 25 µL de TMAH (solución acuosa al 25%) y desecando 12 h en un desecador al vacío a temperatura ambiente. El producto resultante se transfiere al tubo o portamuestras de pirólisis.



UNIDAD DE PIRÓLISIS



Py-GC/MS

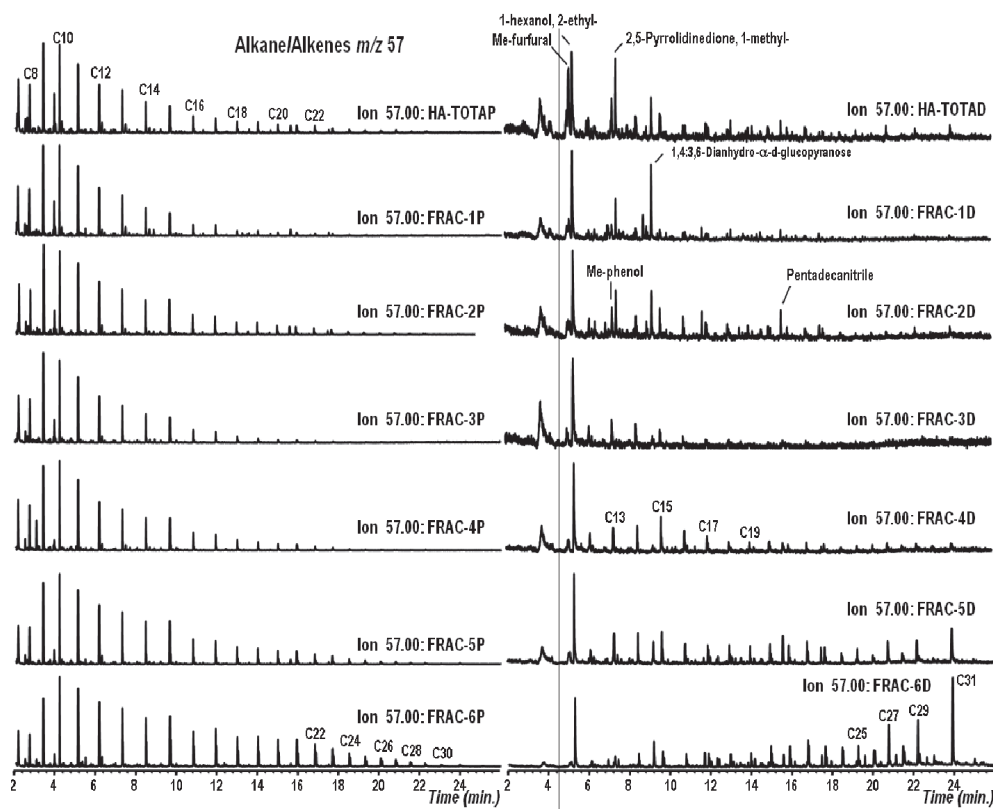


Figura 15. Equipo de Pirólisis Analítica (Py-GC/MS) de doble disparo (Double Shoot) y pirogramas de ión simple (m/z 57 dobles de alcanos/alquenos). Desorción térmica (280 °C) derecha seguida de una pirólisis (500 °C) izquierda.

Si bien esta técnica supone bastantes ventajas respecto a la pirólisis tradicional, introduce cierta complejidad en la elaboración previa de las muestras y además puede generar artefactos durante la reacción. Por ejemplo, se ha propuesto que puede dar lugar a reacciones Cannizzaro que darían lugar a ácidos benecenocarboxílicos a partir de aldehídos aromáticos preexistentes (Tanczos et al., 1977). Lo que si se ha observado experimentalmente es que los efectos de la pirólisis en presencia de TMAH difieren de los de la pirólisis tradicional, parece dependiente de la naturaleza de la muestra analizada y que en todos los casos produce mayor cantidad de constituyentes alquílicos (metilésteres de ácidos grasos...). Es posible que este fenómeno se deba a una termoevaporación temprana de estos compuestos en las fases iniciales de la reacción (Almendros et al., 1998).

Estudio de los productos de degradación de los ácidos húmicos por GC/MS tras degradación por la vía húmeda

Dada la gran complejidad estructural de los ácidos húmicos y las distintas fuerzas moleculares presentes en la matriz húmica, el uso de un único método degradativo generalmente permite identificar sólo una parte del total de la macromolécula. Se han descrito varios procedimientos para degradar y caracterizar las SH (Stevenson, 1982). Cuando se emplean métodos suaves (hidrólisis con ácidos minerales, $K_2S_2O_8$, etc.) el porcentaje de productos liberados es extremadamente bajo, mientras que el empleo de métodos más drásticos (H_2O_2 , $KMnO_4$) rompe la mayor parte de las macromoléculas en fragmentos tan pequeños (CO_2 , H_2O , ácido acético, ácido oxálico...) que aportan poca información estructural (Schnitzer y Khan, 1972; Martin et al., 1981). Asumiendo estas limitaciones, se puede decir que el método ideal debería ser suave, pero al mismo tiempo capaz de proporcionar un alto número de compuestos de degradación y minimizar la formación de artefactos.

Oxidación alcalina con permanganato

La oxidación con permanganato es un procedimiento clásico para el estudio de la composición de los carbonos, que fue utilizado con éxito en los suelos por su carácter enérgico (Ogner, 1973). Transforma la práctica totalidad del ácido húmico en productos solubles, si bien presenta rendimientos limitados por el hecho de que gran parte de la muestra se transforma en CO_2 , H_2O y otros productos de bajo peso molecular sin especial valor diagnóstico. Los resultados de esta técnica también han sido objeto de controversias clásicas por su carácter enérgico, habiéndose indicado que puede distorsionar las concentraciones de los distintos tipos de productos de degradación (mayoritariamente alcanos, ácidos grasos, ácidos alcanodioicos, ácidos fenólicos y ácidos benecenocarboxílicos) produciendo degradación selectiva de estructuras lábiles, y la consiguiente concentración de las más resistentes (Maximov et al., 1977). De hecho, se ha llegado a cuestionar que realmente exista una proporción significativa de ácidos benecenocarboxílicos entre los constituyentes de las SH ya que también podrían ser productos generados por esta técnica. Estudios posteriores demostraron que los rendimientos de degradación con permanganato potásico dependían en gran medida de la temperatura. De esta forma se pueden obtener degradaciones completas a temperatura baja o ambiente que rinden más productos de la serie alifática (Almendros et al., 1989).

La oxidación alcalina con permanganato se lleva a cabo en un reactor de dos o tres bocas provisto de agitador magnético de teflón y colocado sobre un elemento calefactor. En una de las bocas laterales se coloca un termómetro, en otra, un embudo de vertido con llave y en la boca central un refrigerante de reflujo. Se utilizan 100-200 mg de ácido húmico (puede metilarse previamente para proteger los grupos oxigenados) disuelto o suspendido en 25 cm³ de una solución de Na₂CO₃ al 2%. La reacción se lleva a cabo a 90 °C durante unas cuatro horas, durante las cuales se van añadiendo lentamente 70 cm³ de KMnO₄ al 4%. Terminada la reacción, se neutraliza la mezcla de digestión con HCl a pH=3, y se procede a destruir el exceso de permanganato añadiendo bisulfito sódico en polvo hasta la decoloración de la solución granate. La fase acuosa se somete a extracción con un solvente orgánico (acetato de etilo) en un embudo de decantación, o preferiblemente en un extractor líquido-líquido en continuo, durante 12 horas. La fase orgánica con los productos de degradación de la MO se deshidrata con sulfato sódico anhidro y se evapora por destilación o evaporación a presión reducida y finalmente se transfiere a un vial de unos 3-5 cm³ donde se deja evaporar totalmente en horno a 40 °C. Una vez frío se derivatiza (metilación o silylación) para estabilizar los productos de degradación y disminuir su punto de ebullición, lo que facilita la posterior separación e identificación por cromatografía de gases.

Degradación con persulfato potásico

La degradación con persulfato potásico (Martín et al., 1981) es un método de degradación suave, parcial que presenta ciertas características en común con las hidrólisis con agua o con HCl 6M. Se libera gran variedad de productos de degradación que se pueden considerar, con cierto criterio, como menos establemente unido a la estructura macromolecular de las SH y/o de mas reciente incorporación. Esta técnica deja, por lo general, un residuo sin degradar que puede representar entre el 20 y 70% del material de partida y que puede considerarse tanto una porción de SH de estructura muy estable y no susceptible de degradación por métodos suaves como, un producto de condensación secundaria de constituyentes no degradados por el persulfato potásico.

Para la oxidación con persulfato se parte de 100-200 mg de ácido húmico o MO y se introducen en un reactor de teflón donde se añaden 100 cm³ de una solución concentrada de K₂S₂O₈ (2.5%) y calentando 2 h a 140 °C. La reacción también puede hacerse en un frasco de Pyrex de paredes muy gruesas y tapón roscado, procurando que la capacidad del frasco deje suficiente volumen vacío para permitir la concentración de los gases a presión. Una vez frío, el producto de reacción se centrifuga o filtra y se pesa el residuo no degradado. La fase acuosa se somete a extracción con un solvente orgánico (acetato de etilo). Al igual que en el caso anterior de degradación con permanganato, el producto resultante, normalmente metilado, se separa y analiza por cromatografía de gases espectrometría de masas.

Degradación con óxido de cobre

La degradación alcalina con óxido de cobre es un método especialmente indicado para la depolimerización de ligninas y produce compuestos aromáticos característicos con sustituyentes ácidos, aldehídos o cetonas (Hedges y Ertel, 1982). Al haber tres tipos de unidades fundamentales en las ligninas (compuestos de tipos guayacil, siringil y para-hidroxibencil) se producen

en total una docena de productos de degradación a los que se hace referencia como los “doce fenoles índice”. Se ha propuesto que la abundancia relativa de estos compuestos informan, tanto del origen de la lignina (angiospermas, gimnospermas, gramíneas, etc.), como de la proporción de enlaces intramacromoleculares y su grado de alteración (desmetoxilación y carboxilación) en el suelo. Trabajos más recientes demuestran el potencial de esta técnica para desprender OH-ácidos a partir de poliésteres en plantas y suelos (cutinas, suberinas), por lo que también resulta una técnica adecuada para el seguimiento de la alteración progresiva –diagénesis- de macromoléculas relativamente lábiles, al menos en comparación con la resistencia a la degradación que presentan las SH.

Para la oxidación con CuO se parte de unos 50–100 mg de ácido húmico en un reactor a presión, generalmente se usa un cilindro de acero o latón con tapón de rosca y receptáculo interno de teflón. Se añade 1 g de CuO en polvo, 50 mg de sal de Mohr (que actúa previniendo alteraciones de los compuestos en presencia de oxígeno) y 15 cm³ de una solución de NaOH 2M recién hervida. El reactor se cierra preferentemente en atmósfera de N₂ y la reacción tiene lugar a 170 °C durante 3 horas en el interior de un horno. Terminada la reacción, y una vez fríos los reactores, se centrifuga su contenido para recuperar la fase líquida con los productos de la digestión, se lava una vez el residuo con solución de NaOH y se precipita con HCl hasta pH=2. Los productos orgánicos se extraen en un embudo de decantación con éter etílico libre de peróxidos previamente conservado en presencia de sal de Mohr. El extracto orgánico se deseca con sulfato sódico anhidro para eliminar trazas de agua, se evapora por destilación o concentración a presión reducida y, tras la evaporación final del solvente. Finalmente y para evitar oxidaciones o condensaciones posteriores se procede a la inmediata metilación o silylación de los productos de la degradación y las muestras resultantes deben inyectarse a la mayor brevedad posible en el cromatógrafo de gases.

Degradación con perborato de sodio

El tratamiento de los ácidos húmicos con NaBO₃ transforma alrededor de un 40% del peso original en productos solubles en 2 horas y varios tratamientos sucesivos permiten la solubilización total de la muestra sin producir un residuo condensado característico de otros métodos de degradación suave (Almendros et al., 1987, 1992). La ventaja de este reactivo es que, en presencia de ácidos, se desprende peróxido de hidrógeno de forma continua. De esta forma el agente oxidante nunca se encuentra en exceso y, en teoría, no debería producir excesivas alteraciones de los productos que se van desprendiendo progresivamente de la macromolécula húmica. Los productos solubles liberados tras la degradación se analizan por GC/MS y permite interpretar los patrones de distribución de las series alquílicas mayoritarias: alcanos, ácidos grasos, alcoholes y ácidos alcanodioicos y de las series aromáticas: ácidos fenólicos y ácidos bencenocarboxílicos.

La técnica de oxidación con perborato es similar a la descrita para el persulfato sódico. Se parte de unos 100–200 mg de ácido húmico, que es tratado, en el interior de un frasco de vidrio resistente al calor con paredes gruesas y tapón roscado, con 50 cm³ de NaBO₃ al 5% (pH~10,7). Tras calentar 2 horas a 140 °C, el ácido húmico (completamente disuelto por el pH alcalino

de la mezcla de digestión) se precipita con HCl 6M. Se obtienen un precipitado de ácidos húmicos sin degradar y un sobrenadante con aspecto de ácido fúlvico, constituido por oligómeros y productos de degradación solubles. El ácido húmico precipitado se recupera por centrifugación y se deseca y la reacción se repite 4 ó 5 veces hasta la total desaparición del residuo. Los sobrenadante amarillentos se van acumulando en un frasco. Los productos solubles que pueden ser estudiados por CG/MS se extraen con acetato de etilo mientras que el resto de productos de color amarillento se desecha, si bien pueden ser purificados y procesados por las mismas técnicas que los ácidos fúlvicos (concentración en carbón activo o resinas adsorbentes, elución con NaOH 0,1M y paso por resinas de intercambio iónico para eliminar el Na⁺).

PROTOCOLOS EXPERIMENTALES SENCILLOS, A ESCALA DE LABORATORIO, PARA LA SIMULACIÓN DEL EFECTO DEL FUEGO SOBRE MUESTRAS DE SUELO O SUS DISTINTAS FRACCIONES ORGÁNICAS

Simulación del fuego en muestras completas de suelo

La simulación de los efectos del fuego a pequeña escala presenta los problemas de tener que decidir entre modificar la “intensidad del fuego” por medio de experimentos paralelos y secuenciales en los que, o bien se calientan las muestras a temperaturas cada vez más elevadas durante el mismo periodo de tiempo, o se utiliza la misma temperatura durante periodos de duración progresiva. También se podrían combinar ambas posibilidades, con lo que los problemas técnicos de representatividad de los resultados se sumarían. Hay que tener en cuenta que, en experimentos de corta duración, el tamaño, textura, forma y disposición de las muestras es determinante. A determinadas temperaturas puede producirse la quema excesiva en superficie mientras que en el interior puede permanecer muy poco alterada. De hecho, la granulometría de la muestra es importante y pueden obtenerse resultados muy distintos dependiendo de si se extiende la muestra en una cápsula o se amontona en el fondo de un crisol (Figura 16).

Después de haber ensayado diversos procedimientos para la transformación térmica de muestras de suelo, para la mayor parte de los experimentos elegimos el sistema más sencillo y reproducible; someter la muestra original a los efectos de una temperatura constante durante intervalos de tiempo crecientes en un horno eléctrico de mufla. Pueden utilizarse intervalos sucesivos de 20 segundos. Estos intervalos pueden elegirse de forma que resulten representativos de los distintos grados de transformación producidos por los incendios naturales. Intensidades bajas simularía los efectos de los incendios de baja intensidad en los que se destruye la vegetación herbácea o arbustiva y se alteran ligeramente los horizontes superficiales del suelo, sobre todo por el aporte de biomasa quemada. Las muestras calentadas durante más tiempo simularían los incendios de alta intensidad, en que se producen pérdidas de MOS durante la combustión total del bosque cuyos restos permanecen ardiendo sobre el suelo.

En condiciones de laboratorio, las muestras se depositan en capsulas de 100 cm³ (8 cm de diámetro y 3,3 cm de altura) llenas de suelo tamizado a 2 mm, que se introducen en un horno eléctrico precalentado a 1000 °C. La capsula es depositada sobre las puntas de un trípode metá-



Figura 16. Experimento de calentamiento en horno eléctrico de muestras de suelo (temperatura constante a 350 °C, tiempo variable) para estudiar cambios en la composición de lípidos.

lico invertido que evita el contacto directo con el suelo del horno y se cubre con una tapa de porcelana perforada para la entrada de un termopar introducido en el centro del suelo en el crisol. Las cápsulas deben mantenerse separadas de las paredes incandescentes del horno, en nuestros experimentos se mantienen 11, 4,5 y 3 cm, en cada una de las 3 dimensiones. En estas condiciones los experimentos resultan satisfactoriamente reproducibles con respecto a la pérdida de peso y las temperaturas finales alcanzadas a la salida del horno, que en estas condiciones nunca superaron los 650 °C. De forma orientativa, las muestras calentadas en estas condiciones durante 20 segundos alcanzaron la temperatura de 100 °C en el centro del crisol. Las muestras de suelo calentadas 2 minutos y 40 segundos alcanzaron los 400 °C en el momento de extraerlas del horno.

Estas condiciones, y el efecto sobre el suelo, pueden compararse con datos descritos para incendios naturales (DeBano et al., 1977) donde en la capa superficial se registran temperaturas máximas a los 3–5 minutos del incendio y que alcanzan los 700, 400 y 250 °C en función de la intensidad del fuego (alta, media o baja intensidad). A partir de 2–3 cm de profundidad estos valores descienden a 200, 180 y 100 °C, en tanto que por debajo de 5 cm las temperaturas registradas suelen ser inferiores a 100 °C.

Simulación del fuego en fracciones húmicas aisladas

En este caso, y en experimentos en los que se persigue estudiar el efecto del fuego en una fracción orgánica aislada de suelo (materia ligera, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos), se pueden utilizar otros procedimientos más adecuados para trabajar con material que, en general, se encuentra disponible en poca cantidad. Las muestras a calentar son, por lo general, de pequeño volumen y se requiere más control en las condiciones para conseguir resultados reproducibles.

Los experimentos de simulación pueden llevarse a cabo en un horno tubular (porcelana) con circulación de aire, de oxígeno o aire libre de CO_2 , en cuyo caso el gas de salida puede aprovecharse para la medición de diversos compuestos liberados, principalmente CO_2 . Las SH trituradas y homogeneizadas a 0,1 mm son mezcladas con un sustrato mineral relativamente inerte, como puede ser la fracción comprendida entre 2 y 0,2 mm del propio suelo original, tras la extracción de las SH y posteriormente tratado con agua oxigenada para eliminar trazas de C. El calentamiento de fracciones húmicas sin mezcla con sustrato mineral no es adecuado para experimentos de simulación por ser poco representativo de las condiciones naturales y por presentar resultados muy poco reproducibles. De forma alternativa, el calentamiento puede llevarse a cabo en navecillas de 3 cm^3 conteniendo 100 gramos de suelo libre de MO, y 100 mg de fracción húmica purificada. En estas condiciones, se obtienen resultados reproducibles tras calentamiento isoterma en un horno eléctrico precalentado a 350 °C, donde se introducen las navecillas durante periodos comprendidos entre 60 y 120 segundos. En el último caso la muestra puede experimentar una pérdida de MO superior al 50%, lo que ha de tenerse en cuenta cuando se necesita disponer de cantidad suficiente de material para determinadas técnicas (p.ej. RMN) que requieran muestras relativamente grandes (> 100 mg).

CONCLUSIONES

En este capítulo se revisan métodos, técnicas y protocolos empleados en la caracterización de la MO total y sus fracciones normalmente presentes en los suelos, con especial referencia a su utilidad para las investigaciones dirigidas al conocimiento de los efectos del fuego sobre la MOS y las correspondientes sustancias de tipo húmico que en él se encuentran.

Se resalta la importancia de las técnicas para la caracterización molecular de la MO (espectroscopía visible, análisis elemental orgánico, degradación química por la vía seca o húmeda) por cuanto informan sobre modificaciones cualitativas en la MO. Por su parte, los cambios cuantitativos (contenido en las distintas fracciones orgánicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas) debidos al fuego suelen ser muy difíciles de interpretar y varían en función, no sólo de las características del fuego y tipo de incendio, sino de otras muchas variables como el tipo de suelo, vegetación y orografía. Por otro lado, el fuego produce materiales carbonosos resistentes a la oxidación, precisamente es la oxidación de la MO la base de las tecnologías para la cuantificación de la MOS. Otro factor añadido deriva del hecho de que el fuego produce cambios en las propiedades de solubilidad de la MO y a que diferentes fracciones de MOS se definen precisamente por los valores de pH a que pueden disolverse. Por efecto del fuego los ácidos fúlvicos pueden pasar a formar parte de sustancias del tipo de los ácidos

húmicos y éstos a su vez pueden transformarse en huminas o en formas de alto grado de carbonización y conocidas como "black carbon". Por todo ello, la caracterización de las estructuras orgánicas, más que la valoración cuantitativa de las diferentes fracciones del humus, resulta imprescindible para una descripción válida del impacto del fuego, de las repercusiones ambientales que producen los diferentes tipos de incendios y para el seguimiento de la evolución de los suelos afectados por los incendios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación del desarrollo de la Red Temática "Efectos de los incendios forestales sobre los suelos" (CGL2007-28764-E/BTE; CGL2008-01632-E/BTE y CGL2009-06861-E/BTE), así como a los proyectos CGL2006-12730-C03-01 y CGL-2008-04296.

REFERENCIAS

- Almendros, G. 2008. Humic substances. En: W. Chesworth (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 97-99.
- Almendros, G. y Dorado, E., 1985. Estudio de ácidos húmicos de tipo P. Distribución de los pigmentos verdes en las diferentes fracciones húmicas del suelo. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 23, 547-559.
- Almendros, G. y Sanz, J. 1992. A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin. *Geoderma*, 53, 79-95.
- Almendros, G., Ibáñez, J.J., Lobo, M.C. y Polo, A. 1983. Efecto del fuego en las características del humus en un bosque de la zona del Pantano de San Juan (Madrid). VI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Santiago de Compostela.
- Almendros, G., Polo, A., Ibáñez, J. y Lobo, M.C. 1984a. Contribución al estudio de la influencia de los incendios forestales en las características de la materia orgánica del suelo. I: Transformaciones del humus en un bosque de *Pinus pinea* del Centro de España. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 21, 7-20.
- Almendros, G., Polo, A., Lobo, M.C. e Ibáñez, J. 1984b. Contribución al estudio de la influencia de los incendios forestales en las características de la materia orgánica del suelo. II: Transformaciones del humus por ignición en condiciones controladas de laboratorio. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 21, 145-160.
- Almendros, G., Polo, A., Ibáñez, J.J. y Lobo, M.C. 1984c. Contribución al estudio de la influencia de los incendios forestales en las características de la materia orgánica del suelo. I. Transformaciones del humus por ignición en condiciones controladas de laboratorio. *Révue d'Ecologie et Biologie du Sol*, 8, 79-86.
- Almendros, G., Martín, F. y González-Vila, F.J. 1985. Efecto de los incendios forestales sobre los constituyentes orgánicos del suelo. Seminario sobre Bases Ecológicas de la Gestión del Medio Terrestre. Diputación de Barcelona. Servicio de Parques Naturales, Barcelona. Pp 98-99.
- Almendros, G., Martín, F., González-Vila, F.J. 1987. Depolymerization and degradation of humic acids with sodium perborate. *Geoderma*, 39, 235-247.
- Almendros, G., Martín, F. y González-Vila, F.J. 1988. Effects of fire on humic and lipid fractions in a Dystric Xerochrept in Spain. *Geoderma*, 42, 115-127.
- Almendros, G., González-Vila, F.J. y Martín F. 1989a. Alteraciones del humus en bosques mediterráneos continentales afectados por incendios. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires*, 3, 95-99.

- Almendros, G., Sanz, J. y Sobrados, I. 1989b. Characterization of synthetic carbohydrate derived humic like polymers. *Science of the Total Environment*, 81/82, 91-98.
- Almendros, G., González-Vila, F.J. y Martín F. 1990. Fire induced transformation of soil organic matter from an oak forest. An experimental approach to the effects of fire on humic substances. *Soil Science*, 149, 158-168.
- Almendros, G., Sanz, J., González-Vila, F.J. y Martín, F. 1991. Evidence for a polyalkyl nature of soil humin. *Naturwissenschaften*, 78, 359-362.
- Almendros, G., González-Vila, F.J., Martín, F., Fründ, R. y Lüdemann, H.-D. 1992. Solid state NMR studies of fire-induced changes in the structure of humic substances. *Science of the Total Environment*, 117/118, 63-74.
- Almendros, G., González-Vila, F.J., Martín F., Sanz J. y Álvarez Ramis C. 1998. Appraisal of pyrolytic techniques on different forms of organic matter from Cretaceous basement in Central Spain. *Organic Geochemistry*, 28, 613-623.
- Almendros, G., Knicker, H., González-Vila, J.F. 2003. Rearrangement of carbon and nitrogen forms in peat after progressive thermal oxidation as determined by solid-state ^{13}C - and ^{15}N -NMR spectroscopy. *Organic Geochemistry*, 34, 1559-1568.
- Almendros, G., González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A., Knicker, H., Zancada, M.C. y Polvillo, O. 2005. Tentatively quantifying fire impact, organic carbon balance and thermal structural rearrangements by ^{13}C CP/MAS NMR of whole soil samples from Continental Mediterranean forests. 22nd International Meeting on Organic Geochemistry. 12-16 September 2005. Sevilla.
- Aoyama, T. y Shioiri, T. 1990. Trimethylsilyldiazomethane: A convenient reagent for the O-methylation of alcohols. *Tetrahedron Letters*, 31, 5507-5508.
- Breger, I. A. 1966. Geochemistry of lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43, 197-202.
- Buurman, P., Peterse, F. y Almendros, G. 2007. Soil organic matter chemistry in allophanic soils: A pyrolysis-GC/MS study of a Costa Rican Andosol catena. *European Journal of Soil Science*, 58, 1330-1347.
- Challinor, J.M. 1991. The scope of pyrolysis methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 20, 15-24.
- Chen, Y., Senesi, N. y Schnitzer, M. 1977. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal*, 41, 352-358.
- Chone, T., Jacquin, F. y Yaghi, M. 1973. Emploi de ^{14}C et ^{45}Ca comme éléments traceurs de l'humification. *Bulletin ENSAIA*, 15, 69-83.
- Dabin, B. 1971. Étude d'une méthode d'extraction de la matière humique du sol. *Science du Sol*, 1, 47-63.
- DeBano, L.F. 2000. Water repellency in soils: a historical overview. *Journal of Hydrology*, 231-232, 4-32.
- DeBano, L.F., Dunn, P.H., y Conrad, C.E. 1977. Fire's effect on physical and chemical properties of chaparral soils. En: General Technical Report WO-3. United States Department of Agriculture, Forest Service. Ogden, UT.
- Dettweiler, C., Knicker, H., González-Vila, F.J., Almendros, G. y Zancada M.C. 2003. Monitoring the fire impact on soil through chromatographic analysis of the lipid fraction. En: Proc. 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, 19-21 Noviembre. Almería, p.149.
- Dinel, H., Schnitzer, M. y Mehuys, G.R. 1990. Soil lipids: origin, nature, content, decomposition and effect on soil physical properties. En: J.M. Bollag y G. Stotzky (Eds.), *Soil Biochemistry*. Ed. Marcel Dekker, New York, pp 397-429.
- Doerr, S.H., Shakesby, R.A. y Walsh, R.P.D. 2000. Soil water repellency: its causes, characteristics and hydro-geomorphological significance. *Earth-Science Reviews*, 51, 33-35.
- Duchaufour, P. 1975. *Manual de Edafología*. Toray-Masson, SA. Barcelona.
- Duchaufour, P. y Jacquin, F. 1975. Comparaison des processus d'humification dans les principaux types d'humus forestiers. *Bulletin AFES*, 1, 29-36.

- Gonçalves, C.N., Dalmolin, R.S.D., Dick, D.P., Knicker, H., Klamt, E. y Kögel-Knabner I. 2003. The effect of 10% HF treatment on the resolution of CPMAS ^{13}C NMR spectra and the quality of organic matter in ferralsols. *Geoderma*, 116, 373-392.
- González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Polvillo, O., Almendros, G., Knicker, H., Salas, F. y Costa, J.C. 2002a. Wildfire and black carbon production in Andalusian Mediterranean forest. En: D.X. Viegas (Ed.), *Forest Fire Research & Wildland Fire Safety (CD-ROM)* 7 pp. Millpress, Rotterdam, The Netherlands, 244 pp.
- González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Polvillo, O., Almendros, G. y Knicker, H. 2002b. Pyrolytic and spectroscopic approaches to the study of refractory forms of organic carbon. Soils affected by fires. *Reunión Internacional Secuestro de Carbono en Suelos y Biomasa. Xunta de Galicia*. La Coruña, 12 pp.
- González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Almendros, G. y Knicker, H. 2004a. The effect of fire on soil organic matter - a review. *Environment International*, 30, 855-870.
- González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Polvillo, O., Almendros, G. y Knicker, H. 2004b. A first approach to the estimation of black carbon production by forest fires in Andalusian Mediterranean forest. *Edafología*, 11, 219-228.
- González-Vila, F.J. y Almendros, G. 2004. Thermal transformation of soil organic matter by natural fires and laboratory-controlled heatings. En: *Natural and Laboratory-simulated Thermal Geochemical Processes*. Kluwer Academic Publishers, pp. 153-200.
- González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A., Polvillo, O., Almendros, G. y Knicker, H. 2002. Nature of refractory forms of organic carbon in soils affected by fires. Pyrolytic and spectroscopic approaches. En: D.X. Viegas (Ed.), *Forest Fire Research & Wildland Fire Safety (CD-ROM)* 5pp. Millpress, Rotterdam, The Netherlands, 244 pp.
- González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A., Almendros, G., Arias, M.E. y Knicker, H. 2006. Appraisal of biogeochemical markers for the assessment of damage levels in soils affected by wildfires. *General Assembly of the European Geosciences Union (EGU 2006)* April 2-7, Vienna, Austria, EGU06-A-01005.
- González-Vila, F.J., Almendros, G., González-Pérez, J.A., Knicker, H., González-Vázquez, R., Hernández, Z. y Piedra Buena, A. 2009. Transformación de la materia orgánica del suelo por incendios naturales y calentamientos controlados en condiciones de laboratorio. En: A. Cerdà y J. Mataix-Solera (Eds.), *Efectos de los incendios forestales sobre los suelos en España. El estado de la cuestión visto por los científicos españoles*. Universitat de València. Valencia. Pp.: 219-268
- Hedges, J.I. y Ertel, J.R. 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry*, 54, 174-178.
- Hempfling, R., Schulten, H.-R. 2008. Selective preservation of biomolecules during humification of forest litter studied by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 81/82, 31-40.
- Iglesias, T., Almendros, G., Aroca, M.J. y Fernández Bermejo, M.C. 2008. The impact of recurrent wildfire on chemical properties of forest soils under pine from central Spain. *Geophysical Research Abstracts*, Vol. 10, EGU2008-A-11968, 2008; EGU General Assembly 2008, Vienna, Austria, 13 - 18 April 2008.
- Jambu, P., Fustec, E. y Jacquesy, R. 1978. Les lipides des sols: nature, origine, evolution et propriétés. *Science du Sol* 4, 229-240.
- Knicker, H. 2004. Stabilization of N-compounds in soil and organic matter rich sediments - What is the difference? *Marine Chemistry*, 92, 167-195.
- Knicker, H., Almendros, G., González-Vila, F.J., Martín, F. y Lüdemann H.-D. 1996. ^{13}C - and ^{15}N -NMR spectroscopic examination of the transformation of organic nitrogen in plant biomass during thermal treatment. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 1053-1060.

- Knicker, H., Almendros, G., Dettweiler, C., González-Vila, F.J. y González-Pérez, J.A. 2003a. Transformation of the chemical composition of soil organic matter during and after vegetation fires. En: Mechanisms and Regulation of Organic Matter Stabilisation in Soils. Proceedings of the International Conference. October 5-8. Munich, p.22.
- Knicker, H., González-Vila, F.J., Polvillo, O., González-Pérez, J.A., y Almendros, G. 2003b. Distribution of charred organic matter in the humic fractions of a fire affected Xerochrept. CarboEurope Conference "The continental carbon cycle". 19-21 March, 2003. Lisboa.
- Knicker, H., González-Vila, F.J., Polvillo, O., González-Pérez, J.A. y Almendros, G. 2003c. Wild-fire effects on the quantity and quality of soil organic matter as revealed by solid-state NMR and pyrolysis-GC/MS 21st International Meeting on Organic Geochemistry. Cracovia, P II/164.
- Knicker, H., González-Vila, F.J., Polvillo, O., González-Pérez, J.A., y Almendros, G. 2005a. Fire-induced transformation of C- and N- forms in different organic soil fractions from a Dystric Cambisol under a Mediterranean pine forest (*Pinus pinaster*). Soil Biology and Biochemistry, 37, 701-718.
- Knicker, H., Totsche, K.-U., Almendros, G. y González-Vila, F.J. 2005b. Condensation degree of burnt peat and plant residues and the reliability of solid-state VACP MAS ¹³C NMR spectra obtained from pyrogenic humic material. Organic Geochemistry, 36, 1359-1377.
- Knicker, H., Almendros, G., González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A. y Polvillo, O. 2006a. Characteristic alterations of quantity and quality of soil organic matter caused by forest fires in continental Mediterranean ecosystems: a solid-state C-13 NMR study. European Journal of Soil Science, 57, 558-569.
- Knicker, H., González-Vila, F.J., Almendros, G., González-Pérez, J.A. y Polvillo, O. 2006b. Chemical changes of soil organic matter following burning. General Assembly of the European Geosciences Union (EGU 2006) April 2-7, Vienna, Austria, EGU06-A-02334.
- Knicker, H., Hilscher, A., Almendros, G., González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A. y Polvillo, O. 2006c. Characteristic alterations of quantity and quality of humic substances in forest soils caused by wild-fires. 13th Meeting of the International Humic Substances Society. Humic Substances—"Linking Structure to Functions" July 30 to August 4, 2006. Karlsruhe.
- Knicker, H., Hilscher, A., González-Vila, F.J. y Almendros, G. 2007. A new conceptual model for the structural properties of char produced during vegetation fires. Organic Geochemistry, 39, 935-939.
- Kögel-Knabner, I., Hatcher, P.G., Tegelaar, E. W. y de Leeuw, J.W. 1992. Aliphatic components of forest soil organic matter as determined by solid-state ¹³C NMR and analytical pyrolysis. Science of the Total Environment, 113, 89-106.
- Kononova, M.M. 1982. Materia orgánica del suelo. Su naturaleza, propiedades y métodos de investigación. Oikos-Tau ediciones. Barcelona.
- Kumada, K. 1995. Absorption spectra of humic acids. Soil Plant Food, 1, 29-30.
- MacCarthy, P. y Rice, J.A. 1985. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. En: R.G. Aiken, D.M. Mcknight, R.L. Wershaw. Y P. MacCarthy (Eds.), Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Wiley, New York, pp. 527-559.
- Maillard, M.L.-C. 1916. Synthèse des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. Annali di Chimica, 5, 258-317.
- Martín, F., del Río, J.C., González-Vila, F.J. y Verdejo, T. 1995. Pyrolysis derivatization of humic substances. 2. Pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 31, 75-83.
- Martín, F., Sáiz-Jiménez, C. y González-Vila, F.J. 1981. The persulfate oxidation of a soil humic acid, Soil Science, 132, 200-203.
- Maximov, O.B., Shvets, T.V., Elkin y Yu., N. 1977. On permanganate oxidation of humic acids. Geoderma, 19, 63-78.

- Merlet, D. 1971. Mise au point technique concernant l'extraction et la caractérisation des composés organiques présents dans les sols. Centre de Pédologie Biologique, doc n° 15. Centre National de la Recherche Scientifique (Francia). Nancy,
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1973. Comisión de Métodos Analíticos del Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 32, 1153-1172.
- Newman, R.H. 1990. Analysis of results from interrupted-decoupling NMR pulse sequences combined with high speed magic angle spinning. *Journal of Magnetic Resonance*, 86, 176-179.
- Nierop, K.G.J. y Buurman, P. 2007. Thermally assisted hydrolysis and methylation of organic matter in two allophanic volcanic ash soils from the Azores Islands. En: O. Arnalds, F. Bartoli, P. Buurman, H. Oskarsson, G. Stoops y E. García-Rodeja (Eds.), *Soils of volcanic regions in Europe*. Springer, Berlín, pp 411-422.
- Nip, M., Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W. y Schenck, P.A. 1986. A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. *Naturwissenschaften*, 73, 579-585.
- Ogner, G. 1973. Oxidation of nonhydrolyzable humic residue and its relation to lignin. *Soil Science*, 116, 93-99.
- Peersen, O.B., Wu, X., Kustanovich, I. y Smith, S.O. 1993. Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 104, 334-339.
- Piedra Buena, A., González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A. y Almendros G. 2009a. Signature of nitrogen compounds responsive for changes in C and N forms in peat subjected to progressive thermal stress. En: *Natural Organic Matter in Environment and Technology*, Proc. 12th Nordic-Baltic-IHSS Symposium. Tallinn.
- Piedra Buena, A., Almendros, G. y González-Vila F.J. 2009b. Structural transformations of humic matter in terms of fire intensity as revealed by changes in the assemblages of pyrolytic products. En: A. Jordán, L.M. Zavala, J.M. de la Rosa, H. Knicker, J.A. González-Pérez y F.J. González-Vila (Eds.), *Advances in forest fire effects on soils*. Book of Abstracts of the Communications presented to the II International Meeting on Forest Fire Effects on Soils (FUEGORED 2009, Sevilla-Cortegana (Huelva), Nov 4-6, 2009). Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, Universidad de Sevilla. Sevilla.
- Pierce, A.E. 1977. Silylation of organic compounds. Pierce Chemical Co. Rockford.
- Piper, C.S. 1959. *Soil and plant analysis: a laboratory manual of methods for the examination of soils and the determination of the inorganic constituents of plants*. Interscience Publishers, Inc. New York. Pp. 197-201.
- Preston, C.M. 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science*, 161, 144-166.
- Rosenfeld, A. y Kak, A.C. 1982. *Digital Picture Processing Vol. I*. Academic Press. New York.
- Savage, S.M., Osborn, J., Letey, J. y Heaton, C. 1972. Substances contributing to fire-induced water repellency in soil. *Soil Science Society of America Proceedings*, 36, 674-678.
- Schnitzer, M. y Khan, S.U. 1972. *Humic Substances in the Environment*. Dekker. Nueva York.
- Schulten, H.-R., Schitzer, M. 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, 80, 29-30.
- Stevenson, F.J. 1982. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions*. Wiley. New York.
- Tanczos, I., Schöflinger, M., Schmidt, H. y Balla, J. 1977. Cannizaro reaction of aldehydes in TMAH thermochemolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 42, 21-31.
- Tinoco, P., Almendros, G., Sanz, J. y González-Vila, F.J. 2005. Molecular level descriptors of the effect of fire on soils under pine forest in continental Mediterranean soils. 22nd International Meeting on Organic Geochemistry (22nd IMOG), Seville, Spain, 12-16 September 2005. Sevilla.
- Tinoco, P., Almendros, G., Sanz, J., González-Vázquez, R. y González-Vila, F.J. 2006. Molecular descriptors of the effects of fire on continental Mediterranean soils under pine forest. *Organic Geochemistry*, 37, 1995-2018.

- Traina, S.J., Novak, J. y Smeck, N.E. 1990. An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *Journal of Environmental Quality*, 19, 151-153.
- Van Krevelen, D.W. 1950. Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. *Fuel*, 29, 269-284.
- Walkley, A. 1947. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils-effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science*, 63, 251-264.
- Walkley, A. y Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29-38.
- Wilson, M.A. 1987. *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*. Pergamon Press. Oxford.
- Wilson, M.A., Vassallo, A.M., Collin, P.J., Rottendorf, H. 1984. High-resolution carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry and relaxation behavior of organic solids from fossil fuels. *Analytical Chemistry*, 56, 433-436.